第 43 卷 增刊
2000 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 43, Suppl.
May, 2000

文章编号：0454-6296（2000）增刊-0044-07

新疆棉铃虫对溴氰菊酯和硫丹抗性的生化机理研究

王守玉*，谭维嘉，戴小枫，郭予元
（中国农业科学院植物保护研究所，北京 100094）

摘要：通过生物测定和生化分析研究了新疆棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）敏感种群和室内筛选获得的抗性种群对硫丹和溴氰菊酯的反应及其 α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶的动态活性反应。结果表明，筛选后新疆棉铃虫对硫丹和溴氰菊酯产生的抗性倍数分别为 13 倍和 66 倍。两个抗性种群的 α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶比活力均高于敏感种群。相应杀虫剂预处理后，α-乙酸萘酯酶酶活力受到抑制。抗性种群的 α-乙酸萘酯酶对底物的亲和力高于敏感种群，但 V_{max} 低于敏感种群。抗性种群的乙酰胆碱酯酶对底物的亲和力显著低于敏感种群，V_{max} 比敏感种群高。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示，两个抗性种群都有一条特异性酶带，其迁移率相近，且均可被甲基对氧磷抑制。因此推测，α-乙酸萘酯酶参与了新疆棉铃虫对硫丹和溴氰菊酯的抗性，具有代谢和阻断作用；乙酰胆碱酯酶对抗性的产生也起到了重要作用。

关键词：棉铃虫；抗性；硫丹；溴氰菊酯；生化机理
中图分类号：Q965.9　　　**文献标识码**：A

棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）是棉花等作物的重要害虫，90 年代以来，在我国除新疆棉区外的其它棉区均严重发生，给农业生产和国民经济造成巨大损失，其重要原因之一是棉铃虫对常用杀虫剂拟除虫菊酯产生了抗性[1]。新疆棉区由于历史上用药比较少，棉铃虫尚处在敏感时期，但随着种植业结构的调整、耕作制度和栽培制度的改革，棉铃虫等害虫的发生逐渐加重[2]。而国内对新疆棉铃虫抗药性的研究较少，迄今未见报道。因此，开展对新疆棉铃虫抗性发展趋势和抗性治理的研究，可为科学地协调多种防治措施、组建棉铃虫综合防治体系提供理论依据。本文研究了新疆棉铃虫对硫丹和溴氰菊酯的抗性表现，并对其生化机理进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 测试用虫

选用 1997 年采自新疆石河子棉区的棉铃虫，在室内温度（26±1)℃、相对湿度 60%～85%、光周期 16:8（L:D）的条件下饲养。幼虫在指形管中用人工饲料饲养，人工饲料配制

* 现在北京锦绣大地农业股份有限公司工作，北京，邮编：100039
收稿日期：1999-10-10；修订日期：2000-03-10

参照梁革梅等[3]，成虫在产卵笼中用糖水补充营养。无任何杀虫剂在室内连续饲养 3 代，使其种群中个体生理代谢基本一致。分别以硫丹、溴氰菊酯进行室内抗性筛选，获得了抗硫丹 (R-E) 和抗溴氰菊酯（R-D）的种群。以不加任何杀虫剂连续室内饲养多代的棉铃虫为敏感种群对照（CK）。

1.2 化学试剂

碘化硫代乙酰胆碱（acetylthiocholine iodide，ATCh）、Triton X-100 和 5，5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸（5，5'-dithionitrobenzoic acid，DTNB）、α-和 β-乙酸萘酯、坚固牢蓝 RR 盐（fast blue RR salt）、丙烯酰胺购自 Sigma 公司。毒扁豆碱（eserine）、磷酸三苯酯（TPP）、脱叶磷 (DEF)、甲基对氧磷（methyl paraoxon，本文简称为 PARA）从美国 Aldrich 公司购买，其它化学试剂均为分析纯。

1.3 生物测定

采用 FAO 推荐的点滴法。以丙酮将每种药剂稀释为 6～7 个系列浓度，对棉铃虫 3 龄初幼虫（6～7 日龄，平均体重为（25 ± 5）mg/头）进行处理，用 LV-56 型电动微量点滴器将 1 μL 药液逐头点滴在幼虫前胸背板上，每个浓度处理 24 头幼虫，重复 3 次。以丙酮为对照。处理后置于正常人工饲料中饲养，24 h 后检查结果，将结果输入计算机，按 POLO 程序计算出毒力曲线和致死中量。对照组死亡率低于 10％～20％为有效测定。

1.4 离体酶活力测定

1.4.1 试虫处理：采用点滴法处理两个抗性种群的 3 龄幼虫。用微量点滴器将 1 μL 适当浓度的药液点滴在幼虫的前胸背板上，4 h、12 h 和 24 h 后分别取正常存活的个体，经液氮迅速冰冻后，置于 −20℃ 保存备用。同时取未处理的抗性种群和敏感种群的 3 龄幼虫作对照。

1.4.2 酶液制备：取 20 头冷冻备用棉铃虫放在匀浆器中，加入 3 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (含有 1％ Triton X-100)，匀浆。匀浆液在50 000 g、4℃ 离心 30 min，取上清液作为酶液。

1.4.3 α-乙酸萘酯酶活力测定：参照 Van Asperen（1962）[4]的方法。反应液包括：10 μL 酶液，500 μL 0.0004 mol/L 的 α-乙酸萘酯，3.49 mL 磷酸缓冲液（0.04 mol/L pH = 7.0），37℃ 保温 30 min 加入 0.5 mL 显色液（1％坚固牢蓝 B 盐液与 5％ SDS 溶液 2∶5 混合），室温下放置 10 min 后，利用 Hewlett Packard 8452 A 双光束紫外分光光度计测定酶活力，在 600 nm 比色。

1.4.4 乙酰胆碱酯酶活力测定：参照 Ellman（1961）[5]的方法。反应混合液包括，50 μL 酶液 2.80 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 8.0），50 μL 0.075 mol/L 碘化硫代乙酰胆碱，100 μL 0.01 mol/L 5，5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸（DTNB）。在 25℃ 水浴中保温 15 min，加入 100 μL 0.001 mol/L 毒扁豆碱。利用 Hewlett Packard 8452 A 双光束紫外分光光度计测定酶活力，410 nm 处比色。

1.4.5 米氏常数（K_m）和最大反应速度（V_{max}）测定：参照 Cornish-Bowden（1976）[6]的方法。α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶的 K_m 和 V_{max} 值在底物浓度为 $0.094 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ mol/L 之间进行测定，用 Lineweaver-Burk 作图法求出 K_m 和 V_{max}。

1.4.6 蛋白质含量测定：参照 Bradford（1976）[7]的方法。

1.5 酯酶同工酶分析

1.5.1 样品制备：取 20 头冷冻备用的棉铃虫放在匀浆器中，加入提取液（0.16％ Tris,

0.1%巯基乙醇，11%蔗糖)匀浆。匀浆液在50 000 g 4℃ 离心30 min,取上清液作为酶液。

特异性酯酶鉴定使用专一性抑制剂TPP、DEF和PARA。所用抑制剂的浓度为 1×10^{-3} mol/L。酶提取液与抑制剂按一定比例混合后，置于37℃反应15～20 min后，加样。

1.5.2 电泳：采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳。

分离胶浓度为7.5%，浓缩胶浓度为4%。酯酶染色参照Devonshire（1975）[8]的方法。以α-乙酸萘酯和β-乙酸萘酯为底物，以坚固牢蓝RR盐为酯酶染色试剂，染色时间约10 min。

1.6 统计学分析

本试验所有统计学分析均采用SAS的方法。差异显著性通过PROC ANOVA进行分析。

2 结果与分析

2.1 生物测定

经室内筛选后，新疆棉铃虫对硫丹和溴氰菊酯产生了一定程度的抗性，抗性倍数分别为13倍和66倍（表1）。

表1 杀虫剂对棉铃虫的毒力测定结果

Table 1 The response of resistance and susceptible *H. armigera* to endosulfan and deltamethrin

药剂 Insecticides	种群 Populations	斜率±*SE* Slope	LD_{50} (μg/g) (95%置信限)	R/S
硫丹 Endosulfan	敏感种群 (Susceptible)	2.06 ± 0.3	2.02 (1.16～11.92)	13
	抗性种群 (Resistance)	2.34±0.4	27.12 (19.44～37.36)	
溴氰菊酯 Deltamethrin	敏感种群 (Susceptible)	0.60 ± 0.2	0.14 (0.01～0.51)	66
	抗性种群 (Resistance)	0.98±0.3	9.19 (2.12～31.72)	

2.2 抗性种群代谢酶的动态分析

2.2.1 酶活力比较：分别测定新疆棉铃虫敏感种群（CK），未处理的硫丹抗性种群（$R\text{-}E_0$）和以硫丹预处理4 h（$R\text{-}E_4$）、12 h（$R\text{-}E_{12}$）、24 h（$R\text{-}E_{24}$）的硫丹抗性种群，以及未处理的溴氰菊酯抗性种群（$R\text{-}D_0$）、以溴氰菊酯预处理4 h（$R\text{-}D_4$）、12 h（$R\text{-}D_{12}$）、24 h（$R\text{-}D_{24}$）后的抗性种群的α-乙酸萘酯酶比活力和乙酰胆碱酯酶比活力（表2）。

从表中结果可以看出，与敏感种群相比，两个抗性种群两种酶的活性都显著升高。相应杀虫剂预处理后，抗性种群α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶都表现为活力下降。

2.2.2 α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶的动力学研究：两种酶的动力学参数 K_m 和最大反应速度 V_{max}数据见表3。由表3可以看出，硫丹抗性种群α-乙酸萘酯酶的 K_m 和 V_{max}值显著降低；乙酰胆碱酯酶的 K_m 和 V_{max}值显著升高。硫丹预处理后，其α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶的 K_m 和 V_{max}值显著降低。

表 2　敏感种群和不同处理抗性种群的α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶比活力

Table 2　α-Naphthylacetate esterase and aceylcholinesterase activities of the resistant and susceptible populations

	α-乙酸萘酯酶比活力 α-Naphthylacetate activities (μmol /(mg·min))	乙酰胆碱酯酶比活力 Aceylcholinesterase activities (μmol /(mg·min))
CK	45.0328±1.26 D d	1.1874±0.012 B b
R-E_0	60.0370±2.50 B b	1.7251±0.143 A a
R-E_4	64.7242±1.16 A a	1.1240±0.031 BC bc
R-E_{12}	55.2791±1.43 C c	0.9966±0.105 BC c
R-E_{24}	58.5070±1.17 BC b	0.9783±0.046 C c
CK	45.0328±1.26 C c	1.1874±0.012 C c
R-D_0	82.8629±6.76 A a	1.8698±0.006 B b
R-D_4	79.1789±3.12 AB a	2.1181±0.128 A a
R-D_{12}	70.4637±1.50 B b	1.9680±0.050 AB b
R-D_{24}	71.6397±1.21 AB ab	1.2521±0.110 C c

注：同一列内具有相同字母表示差异不显著（$P>0.05$）

Data in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P>0.05$);

表 3 同（The same for Table 3）

与敏感种群相比，溴氰菊酯抗性种群的α-乙酸萘酯酶 K_m 值和 V_{max} 值都显著降低；乙酰胆碱酯酶 K_m 值和 V_{max} 值变化不显著。溴氰菊酯预处理后，α-乙酸萘酯酶 K_m 值和 V_{max} 值变化不显著；但 AChE 对底物亲和力降低。

表 3　敏感种群和不同处理抗性种群的α-乙酸萘酯酶和乙酰胆碱酯酶动力学参数

Table 3　Dynamics of α-Naphthylacetate esterase and aceylcholinesterase of the resistant and susceptible populations

	α-乙酸萘酯酶 α-Naphthylacetate esterase		乙酰胆碱酯酶 Aceylcholinesterase	
	K_m (μmol/L)	V_{max} (μmol /(mg·min))	K_m (μmol/L)	V_{max} (μmol /(mg·min))
CK	1.22±0.04 A a	488.1±16.8 A a	4.57±0.95 C c	3.51±0.34 C c
R-E_0	0.43±0.12 B b	89.8±20.7 B b	10.09±0.66 A a	7.13±0.14 A a
R-E_4	0.39±0.03 BC b	86.6±2.65 B b	5.90±0.63 C c	4.42±0.37 B b
R-E_{12}	0.24±0.01 C c	58.8±1.21 B c	8.02±0.64 B b	4.84±0.22 B b
R-E_{24}	0.25±0.05 C c	64.9±9.35 B c	8.34±1.18 AB b	4.83±0.49 B b
CK	1.22±0.04 A a	488.1±16.8 A a	4.57±0.95 B b	3.51±0.34 A b
R-D_0	0.28±0.05 B b	255.9±47.4 B b	5.37±0.01 AB b	3.53±0.24 A ab
R-D_4	0.22±0.01 B b	222.3±7.0 B bc	6.39±0.06 A a	3.50±0.25 A b
R-D_{12}	0.23±0.03 B b	206.2±15.1 B c	6.74±0.64 A a	3.74±0.16 A ab
R-D_{24}	0.26±0.04 B b	228.5±20.9 B bc	6.48±0.38 A a	3.91±0.09 A a

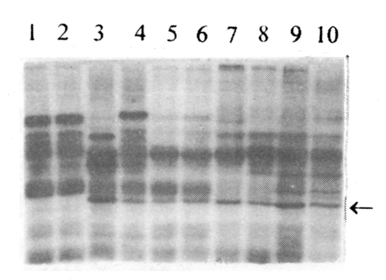


图1　敏感种群及不同处理抗性种群酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 1　Polyacrylamide gel electrophoretogram of esterase isoenzyme in susceptible and different pre-treatment resistant larvae of *H. armigera*. Gel was stained with 1-naphthylacetate

1～6：CK，CK，R-E_0，R-E_4，R-E_{12}，R-E_{24}；

7～10：R-D_0，R-D_4，R-D_{12}，R-D_{24}

2.3　酯酶同工酶分析

图1所示，经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，抗性种群比敏感种群多一条酶带（图1中"←"所示）。相应杀虫剂预处理没有显示出对这条酶带活性的抑制作用（图1）。特异性抑制剂对未处理抗性种群的鉴定表明，DEF和TPP都不能抑制这条带的活性；但甲基对氧磷能抑制其活性（图2，图3），初步推测该酶带为乙酰胆碱酯酶同工酶。

3　讨论

昆虫体内生理生化机制的变异是其对杀虫剂产生抗性的主要原因之一，生理生化机制的变异程度决定着昆虫的抗性水平。

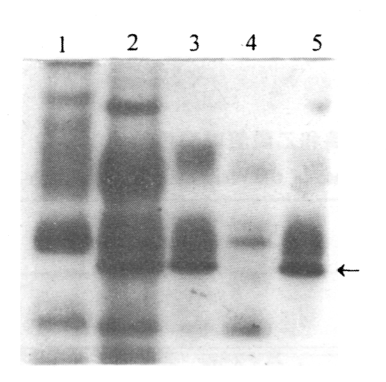


图2　特异性抑制剂处理的敏感和溴氰菊酯抗性种群酯酶

Fig. 2　Polyacrylamide gel electrophoretogram of eaterase in susceptible and endosulfan-resistant larvae of *H. armigera*, inhibited by TPP、DEF、Methyl paraoxon

1：CK；2：R-E；3～5：DEF，PARA，TPP抑制

(Inhabited by DEF，PARA，TPP)

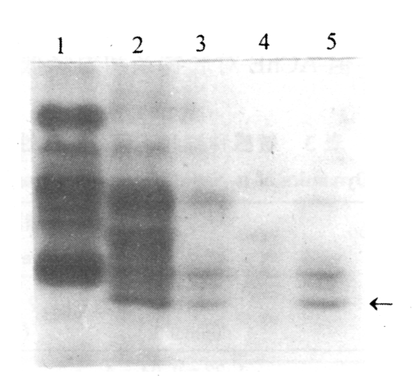


图3　特异性抑制剂处理的敏感和硫丹抗性种群酯酶电泳图谱

Fig. 3　Polyacrylamide gel electrophoretogram of esterase in susceptible and deltamethrin-resistant larvae of *H. armigera*, inhibited by TPP、DEF、Methyl paraoxon

1：CK；2：R-D；3～3：DEF，PARA，TPP抑制

(Inhabited by DEF，PARA，TPP)

已有的试验证实，酯酶的变异是许多昆虫产生抗性的原因[9,10]。本文的研究表明，α-乙酸萘酯酶参与了新疆棉铃虫对硫丹和溴氰菊酯两种杀虫剂的抗性。两个抗性种群的α-乙酸萘酯酶

的活力均高于敏感种群，酶对底物的结合能力大于敏感种群，但最大反应速度（V_{max}）并没有升高。相应杀虫剂预处理后，α-乙酸萘酯酶的活性受到一定抑制。因而初步推测，α-乙酸萘酯酶在棉铃虫对上述杀虫剂产生的抗性中起一定作用，但其主要不是参与对杀虫剂的代谢，而是作为阻断剂与上述两种杀虫剂结合，从而保护靶标部位免受杀虫剂的攻击。这与 Gunning 等[11]报道的 α-乙酸萘酯酶在棉铃虫对拟除虫菊酯抗性中的作用是一致的。Gunning 等发现，棉铃虫 α-乙酸萘酯酶能以拟除虫菊酯及其类似物为底物，但对其代谢作用的研究表明，抗性棉铃虫 α-乙酸萘酯酶对氰戊菊酯有微弱的代谢作用，敏感棉铃虫却无代谢作用，由此认为，酯酶代谢参与棉铃虫对拟除虫菊酯的抗性，但催化活性比较低，在抗性中其主要是作为拟除虫菊酯的阻断剂起作用。

乙酰胆碱酯酶是中枢神经系统参与神经冲动传导的重要的水解酶，一般认为该酶与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性有关[12]。但谭维嘉等[13]根据试验推测，乙酰胆碱酯酶可能参与了棉铃虫对溴氰菊酯的抗性，抗性种群中可能有不同类型的酶。我们的试验也证实了这一点。两个抗性种群的乙酰胆碱酯酶活力均高于敏感种群。硫丹抗性种群中，酶对底物的亲和力显著低于敏感种群；相应杀虫剂预处理后，溴氰菊酯抗性种群酶对底物的亲和力显著下降。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示，两个抗性种群都有一条特异性乙酰胆碱酯酶酶带，证明该酶在新疆棉铃虫对这两种杀虫剂的抗性中起一定的作用。两个抗性种群的特异性酶带迁移率相近，其是否为同一种酶，有待于进一步分析鉴定。

有机氯和拟除虫菊酯杀虫剂作为神经毒剂，昆虫对其抗性主要表现为两个方面，一是解毒酶代谢作用增强，二是靶标部位对杀虫剂的敏感性下降。但乙酰胆碱酯酶与棉铃虫对这两类杀虫剂抗性的关系尚未见报道，其在昆虫抗性机制中的作用有待于进一步研究。

致谢　试验中吴孔明、王武刚、梁革梅、徐广诸位老师和孙鲁娟、张健华、张永军几位研究生提供帮助，在此表示感谢。

参 考 文 献 (References)

[1] 戴小枫，郭予元. 棉铃虫大暴发的成因分析. 植物保护，1993，(4)：35～37

[2] 邱式邦主编. 中国植物保护研究进展. 北京：中国科学技术出版社. 1996，120～123

[3] 梁革梅. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护，1999，25 (2)：15～17

[4] Van Asperen. A study of housefly esterase by means sensitive colormetric method. J. Insect. Physiol., 1962 , 8: 401～406

[5] Ellman G, Courtney L, Andres K D *et al*. A new and rapid colorirmetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. J. , 1961, 7: 88～95

[6] Cornish-Bowden A. Principles of enzyme kinetics. 1st edition, London: Buterworth Press. 1976

[7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein unitizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 1976 , 72: 248～254

[8] Devonshire A L. Studies of the carboxylesterases of *Myzus persicae* resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. Proc 8th Brit Insectic Fungic Conf., 1975, 1: 67～73

[9] Glenn D C, Hoffmann A A, McDonald G *et al*. Resistance to pyrethroids in *Heliothis armigera* from corn: adult resistance , larval resistance and fitness effects. J. Econ. Entomol. , 1994, 87 (5): 1 165～1 171

[10] De Villar M I P, Van Der Pas L J T *et al*. An unusual type of malathion-carboxylesterase in a Japanese strain of housefly. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1983, 19: 60~65

[11] Gunning R V, Graham D, Moores. Esterases and esfenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1996, 54: 12~23

[12] 唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 农业出版社. 1993

[13] 谭维嘉, 梁革梅, 郭予元. 棉铃虫对拟除虫菊酯杀虫剂敏感性的修复及其乙酰胆碱酯酶的变化. 昆虫学报, 1997, 40 (增刊): 35~42

Biochemical mechanism of resistance to endosulfan and deltamethrin in cotton bollworm in Xinjiang Uygur Autonomous Region

WANG Shou-yu, TAN Wei-jia, DAI Xiao-feng, GUO Yu-yuan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: By applying bioassays and biochemical analyses, the reactions to endosulfan and deltamethrin of two cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) populations, the susceptible one (collected from Xinjiang) and resistant one (by indoor selection using endosulfan and deltamethrin), and the activity dynamics of their α-naphthylacetate esterase and acetylcholinesterase (AChE) were tested. The results showed that the resistance ratios to endosulfan and deltamethrin were 13 and 66 folds in Xinjiang cotton bollworm after selection. α-Naphthylacetate esterase and aceylcholinesterase activities of the resistant populations were higher than that of the susceptible. Pretreated with corresponding insecticides the activity of α-naphthylacetate esterase was inhibited. The affinity of α-naphthylacetate esterase to the substrate was higher in the 2 resistant populations than the susceptible, while the maximum velocity (V_{max}) was lower. But the affinity of AChE to the substrate was lower and V_{max} was higher. It was found on the PAGE profiles that the 2 resistant populations possessed a special band and the immigration rate of this band was similar. In the resistance and susceptible populations the activity of this enzyme band can be inhibited by the inhibitor methyl paraoxon of aceylcholinesterase. These results suggested that α-naphthylacetate esterase had involved in hydrolysis and sequestration and AChE played an important role in the resistance mechanism of cotton bollworm to the 2 insecticides.

Key words: cotton bollworm; resistance; endosulfan; deltamethrin; biochemical mechanism